

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Pengumpulan Bahan dan Determinasi Kulit Batang Kayu Manis (*Cinnamomum burmanni* Nees ex Bl.)

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah kulit batang kayu manis (*Cinnamomum burmanni* Nees ex Bl.) kering yang diperoleh dari daerah Lembang, Bandung. Determinasi bahan dilakukan di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati ITB.

4.2. Penyiapan Simplisia

Kulit batang kayu manis (*Cinnamomum burmanni* Nees ex Bl.) kering diserbukkan dengan menggunakan mesin giling untuk memperkecil ukuran patikel dan diperoleh serbuk simplisia dari kulit batang kayu manis (*Cinnamomum burmanni* Nees ex Bl.).

4.3. Penetapan Parameter Standar

4.3.1. Organoleptis

Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan panca indera untuk mendeskripsikan dari bentuk, warna, dan bau.

4.3.2. Penetapan kadar sari larut air

Sejumlah lima gram serbuk yang telah dikeringkan diudara dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air-kloroform P menggunakan labu bersumbat sambil sekali-kali dikocok pada enam jam pertama kemudian dibiarkan selama 18

jam. Disaring 20 mL filtrat dan diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal yang berdasar rata yang telah ditara kemudian sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara.

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{Berat cawan isi} - \text{berat cawan kosong}}{\text{Berat simplisia}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

(Departemen Kesehatan RI, 2000)

4.3.3. Penetapan kadar sari larut etanol

Sejumlah lima gram serbuk yang telah dikeringkan diudara dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol (95%) menggunakan labu bersumbat sambil sekali-kali dikocok pada enam jam pertama kemudian dibiarkan selama 18 jam. Disaring 20 mL filtrat dan diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal yang berdasar rata yang telah ditara kemudian sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut etanol dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara.

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{Berat cawan isi} - \text{berat cawan kosong}}{\text{Berat simplisia}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

(Departemen Kesehatan RI, 2000)

4.3.4. Penetapan kadar abu total

Sebanyak dua gram serbuk digerus dan ditimbang lalu dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, serbuk diratakan. Bahan dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan dan ditimbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, maka ditambahkan air panas lalu

disaring melalui kertas saring bebas abu. Sisa bahan dan kertas saring dipijarkan dengan krus yang sama. Filtrat dimasukkan kedalam krus, diuapkan, dan dipijarkan pada suhu 450⁰C hingga bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara, kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{berat abu (g)}}{\text{berat bahan awal (g)}} \times 100\%$$

(Departemen Kesehatan RI, 2000:17)

4.3.5. Penetapan kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu, dididihkan dengan 25 mL asam hidroklorida encer selama lima menit. Bahan yang tidak larut asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu dan dicuci dengan air panas. Kemudian dipijarkan hingga bobot tetap dan ditimbang. Kadar abu yang tidak larut asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara, kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{berat abu tidak larut asam (g)}}{\text{berat bahan awal (g)}} \times 100\%$$

(Departemen Kesehatan RI, 2000:17).

4.3.6. Penetapan kadar abu larut air

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 mL air selama lima menit, bagian yang tidak larut dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan selama 15 menit pada suhu tidak lebih dari 450⁰C hingga bobot tetap dan ditimbang. Perbedaan bobot

sesuai dengan jumlah abu yang larut dalam air. Kadar abu larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara, kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar abu larut air} = \frac{\text{berat abu total (g)} - \text{berat abu tidak larut air (g)}}{\text{berat bahan awal (g)}} \times 100\%$$

(Departemen Kesehatan RI, 2000:17).

4.3.7. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi. Tabung penerima, labu, dan tabung pendingin dibersihkan dengan asam, dibilas dengan air lalu dikeringkan. Sebanyak 200 mL toluene dan dua mL air disuling dalam labu selama dua jam, didinginkan selama 30 menit, dan volume air dibaca sebagai volume destilasi pertama. Sebanyak 20 gram serbuk simplisia ditimbang seksama dan dimasukkan ke dalam labu destilasi bersama batu didih. Kemudian labu dipanaskan perlahan hingga cairan didalamnya mendidih. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluene kemudian penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima dibiarkan mendingin pada suhu kamar dan air yang menempel pada tabung penerima dilepaskan dengan mengetuk tabung. Air dan toluene dibiarkan mendidih memisah menjadi dua lapisan dan volume air dibaca sebagai volume destilasi kedua.

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume air} \times B_j \text{ air}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

(Departemen Kesehatan RI, 2000:14)

4.4. Penapisan Fitokimia Simplisia dan Ekstrak Kulit Batang Kayu Manis (*Cinnamomum burmanni* Nees ex Bl.)

4.4.1. Identifikasi golongan alkaloid

Sebanyak dua gram serbuk simplisia atau ekstrak ditambahkan lima mL ammonia 25% dan 20 mL kloroform kemudian digerus kuat dan disaring. Filtrat yang diperoleh dibagi menjadi dua bagian. Filtrat bagian pertama diteteskan pada kertas saring dan ditambahkan beberapa tetes pereaksi Dragendorff. Warna merah atau jingga yang terbentuk pada kertas saring menunjukkan adanya alkaloid pada simplisia. Filtrat bagian kedua diekstraksi cair-cair dengan HCl 10% dan pada lapisan air ditambahkan masing-masing pereaksi Dragendorff dan pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan jingga atau merah bata pada lapisan air yang ditambahkan pada pereaksi Dragendorff dan endapan putih pada lapisan air yang ditambahkan pereaksi Mayer menunjukkan adanya alkaloid pada simplisia (Fransworth, 1966:253).

4.4.2. Identifikasi golongan flavonoid

Sebanyak satu gram serbuk simplisia atau ekstrak kulit batang kayu manis ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama lima menit lalu disaring. Filtrat ditambahkan serbuk magnesium, dan asam hidroklorida 2N, lalu ditambahkan amil alkohol dan dikocok kuat, dibiarkan memisah. Jika terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid (Fransworth, 1966:263).

4.4.3. Identifikasi golongan polifenolat

Satu spatel simplisia atau ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi, lalu ditambahkan air secukupnya dan dipanaskan diatas penangas air kemudian

disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan larutan pereaksi besi (III) klorida, apabila timbul warna hijau atau biru hijau, merah ungu, biru hitam sampai hitam menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Fransworth, 1966:255).

4.4.4. Identifikasi golongan saponin

Sebanyak satu gram serbuk simplisia atau ekstrak masing-masing ditambahkan dengan 100 mL air panas, dididihkan selama lima menit, kemudian disaring. Filtrat dalam tabung reaksi dikocok vertikal selama 10 detik, kemudian dibiarkan selama 10 menit. Terbentuknya busa selama kurang lebih 10 menit dengan ketinggian 1-10 cm maka saponin positif. Busa ditambah dengan HCl 2N beberapa tetes, apabila busa hilang maka saponin negatif sedangkan jika busa tidak hilang maka positif (Fransworth, 1966:258).

4.4.5. Identifikasi golongan tanin

Sebanyak satu gram serbuk simplisia atau ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi dan ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama lima menit, kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi dua. Pertama, filtrat ditambahkan FeCl_3 akan terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan (tanin positif). Kedua, filtrat ditambahkan dengan gelatin 1% terbentuk endapan putih maka tanin positif (Fransworth, 1966:264).

4.4.6. Identifikasi golongan steroid dan triterpenoid

Simplisia atau ekstrak digerus dengan eter, lalu dipipet sambil disaring. Filtrat diuapkan hingga kering. Residu ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Warna merah-ungu menunjukkan positif adanya triterpenoid,

sedangkan bila warna hijau-biru yang timbul menunjukkan positif steroid (Fransworth, 1966:259).

4.4.7. Identifikasi golongan kuinon

Sebanyak satu gram serbuk simplisia atau ekstrak ditempatkan pada tabung reaksi dan ditambahkan pada 100 mL air panas, dididihkan lima menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan NaOH 5% apabila membentuk warna jingga menandakan positif kuinon (Fransworth, 1966:265-266).

4.5. Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Batang Kayu Manis (*Cinnamomum burmanni* Nees ex Bl.)

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara maserasi. Serbuk simplisia kulit batang kayu manis (*Cinnamomum burmanni* Nees ex Bl.) ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan pelarut etanol 96% sampai serbuk simplisia terendam. Pelarut dilebihkan setinggi kurang lebih 2,5 cm diatas permukaan serbuk (Harborne, 1987). Proses maserasi ini dilakukan selama tiga hari. Setelah itu larutan disaring untuk memisahkan antara ampas dan filtratnya. Residu yang diperoleh kemudian diekstraksi kembali dengan etanol 96% sebanyak dua kali. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan, lalu disaring dengan menggunakan kertas saring dan diuapkan pelarutnya dengan *vacuum rotary evaporator*. Selanjutnya ekstrak diuapkan di atas penangas air hingga diperoleh ekstrak kental, lalu ditimbang. Persen rendemen ekstrak dihitung dengan rumus:

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak (g)}}{\text{bobot simplisia (g)}} \times 100\%$$

(Sumiwi dkk., 2011:4)

4.6. Optimasi Basis Masker Gel *Peel Off*

Tabel IV.1 Orientasi basis masker gel *peel off*

Komposisi bahan	Formula masker gel (%)			
	F1	F2	F3	F4
PVA	10	12	10	12
HPMC	1	1	2	2
Gliserin	5	5	5	5
Propilen glikol	5	5	5	5
Aquadestilata ad	100	100	100	100

Bahan-bahan tambahan masker gel *peel off* disiapkan sesuai dengan formula yang telah ditentukan pada **Tabel IV.1**. PVA dikembangkan dalam aquadest bersuhu 90°C sambil diaduk menggunakan magnetik *stirrer* kecepatan rendah selama enam jam. HPMC dilarutkan dalam aquadest bersuhu ruangan ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) dan disimpan didalam lemari pendingin selama 24 jam hingga mengembang sempurna. HPMC dimasukkan sedikit demi sedikit kedalam massa PVA. Kemudian ditambahkan propilen glikol dan gliserin. Kemudian diaduk menggunakan *stirrer* dengan kecepatan 50 rpm selama 30 menit hingga campuran homogen.

Evaluasi basis meliputi pengamatan organoleptis, uji homogenitas, uji viskositas, uji pH sediaan, kemampuan menyebar, serta kecepatan waktu mengering. Basis dengan karakteristik fisik paling baik akan dipilih untuk formulasi masker gel *peel off* antioksidan.

4.7. Pembuatan Masker Gel *Peel off* Mengandung Ekstrak Kulit Batang Kayu Manis

Tabel IV.2 Formulasi masker gel *peel off* mengandung ekstrak kulit batang kayu manis (KBKM)

Komposisi bahan	Konsentrasi (%)
Ekstrak KBKM	1
PVA	12
HPMC	1
Gliserin	5
Propilen glikol	5
Nipagin	0,2
Nipasol	0,05
Aquadestilata ad	100

Formulasi basis terbaik dipilih berdasarkan hasil uji evaluasinya. Kemudian dilakukan prosedur seperti yang terdapat pada pembuatan basis, tetapi dengan penambahan ekstrak kulit batang kayu manis yang telah dilarutkan dalam gliserin sedikit demi sedikit. Nipagin dan nipasol dilarutkan menggunakan propilen glikol dan dimasukkan kedalam campuran basis yang telah mengandung ekstrak KBKM. Campuran bahan sesuai dengan yang tercantum pada **Tabel IV.2** kemudian diaduk hingga homogen menggunakan *stirrer* dengan kecepatan 50 rpm selama 30 menit sampai campuran homogen.

4.8. Evaluasi Fisik Sediaan Masker Gel *Peel off* Mengandung Ekstrak Kulit Batang Kayu Manis

Evaluasi fisik sediaan meliputi pengamatan organoleptis, uji homogenitas, viskositas, pH, waktu mengering, stabilitas dipercepat, dan *freeze thaw*.

4.8.1 Pengamatan organoleptis

Dilakukan dengan mengamati perubahan-perubahan bentuk, warna, dan bau dari sediaan masker gel *peel off* mengandung ekstrak kulit batang kayu manis.

4.8.2 Uji homogenitas

Sediaan dioleskan pada permukaan kaca objek, kemudian disebar dengan bantuan kaca objek yang lain untuk mendapatkan permukaan yang homogen dibawah mikroskop.

4.8.3 Uji viskositas

Sebanyak dua gram sediaan ditempatkan pada alat *Viskometer Brookfield RV* menggunakan *spindle* nomor 15 dengan kecepatan 10 rpm, dan alat dijalankan. Kemudian viskositas dari sediaan akan terbaca.

4.8.4 Uji pH

Pengujian pH dilakukan menggunakan pH meter *Backham* untuk sediaan semisolid. Alat sebelumnya dikalibrasi. Sampel dilarutkan ke dalam aquadestilata, kemudian elektroda pH meter dicelupkan ke dalam larutan sampel sampai kata "*drift*" pada layar hilang dan hasil pH dicatat.

4.8.5 Uji kemampuan menyebar

Sebanyak satu gram sediaan diletakkan diatas kaca berukuran 20 x 20 cm dan ditutupi dengan kaca lain yang berukuran sama. Pemberat diletakkan diatas kaca kedua hingga mencapai bobot 125 g. Diameter sediaan yang terbentuk diukur.

4.8.6 Uji waktu mengering

Pengujian ini dilakukan dengan cara mengoleskan sediaan ke punggung tangan dan diamati waktu yang diperlukan sediaan untuk mengering, yaitu dari saat mulai dioleskan hingga benar-benar terbentuk lapisan kering. Kemudian waktu tersebut dibandingkan dengan waktu kering masker produk di pasaran.

4.8.7 Uji stabilitas dipercepat

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui perubahan fisik dari sediaan yang signifikan. Pengujian ini dilakukan selama 28 hari pada suhu 40°C, dan pengamatan dilakukan setiap tujuh hari meliputi pengamatan organoleptis, uji homogenitas, kecepatan waktu mengering, viskositas, kemampuan menyebar, dan pH sediaan.

4.8.8 Uji freeze thaw

Evaluasi dilakukan untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap kestabilan sediaan. Pengujian dilakukan selama enam siklus. Satu siklus terdiri dari 48 jam disimpan pada suhu 4°C dan 48 jam pada suhu 40°C. Diamati ada tidaknya pemisahan fasa pada suhu kamar pada akhir siklus ke 1, 2, 3, 4, 5, dan 6.

4.9. Uji Aktivitas Antioksidan

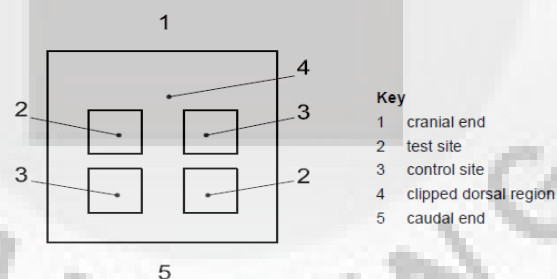
Pengujian aktivitas antioksidan sediaan dilakukan dengan mengukur inhibisi terhadap DPPH dengan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang maksimum larutan DPPH, yaitu antara 512-520nm (Molyneux, 2004).

Sediaan dilarutkan di dalam aquadest terlebih dahulu, selanjutnya untuk pengkondisian sediaan dilarutkan dalam metanol, kemudian larutan dibuat dalam

berbagai konsentrasi. Masing-masing larutan sampel dimasukkan ke dalam vial, ditambahkan larutan DPP dengan perbandingan 1:1, dan didiamkan selama 30 menit. Absorbansi DPPH diukur pada panjang gelombang maksimumnya. Kemudian ditentukan % inhibisi dari sediaan, dan dihitung nilai IC_{50} dari sampel uji yang berupa ekstrak KBKM, basis sediaan masker gel *peel off*, sediaan masker gel *peel off* mengandung ekstrak KBKM, dan vitamin C sebagai kontrol.

4.10. Uji Iritasi

Pada pengujian ini digunakan tiga ekor kelinci albino jantan galur New Zealand dengan berat badan tidak kurang dari dua Kg. Sebanyak 0,5 g atau 0,5 mL sediaan diaplikasikan pada setiap bagian yang ditunjukkan pada **Gambar IV.1**.



Gambar IV.1 Lokasi pengaplikasian sediaan pada kelinci (ISO, 2010:9)

Tutup bagian yang telah ditandai dengan penutup non-oklusif selebar 2,5 cm x 2,5 cm dan balut dengan perban (semi-oklusif atau non-oklusif) selama minimal 4 jam. Setelah itu lepaskan penutup dan tandai bagian tersebut dengan spidol permanen. Bersihkan sisa sediaan dengan menggunakan air hangat, kemudian keringkan. Dilihat adanya eritema atau udem pada kelinci uji dan

ditentukan skor keparahannya yang dapat dilihat pada **Tabel I.1**. Seluruh skor dijumlahkan dan hasil pengujian didapatkan dari **Tabel IV.1**.

Tabel IV.1 Kategori indeks iritasi primer atau kumulatif pada kelinci

Skor rata-rata	Kategori respon
0 - 0,4	Sangat ringan
0,5 - 1,9	Ringan
2 - 4,9	Sedang
5 - 8	Berat

